

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-507387

(43) 公表日 平成9年(1997)7月29日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 9/127		7329-4C	A 6 1 K 9/127	L
31/70	A D U	9051-4C	31/70	A D U
	A D Y			A D Y
35/76		9283-4C	35/76	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 41 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-517818  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)12月27日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)6月27日  
 (86) 国際出願番号 P C T / F R 9 4 / 0 1 5 3 6  
 (87) 国際公開番号 W O 9 5 / 1 8 2 2 3  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)7月6日  
 (31) 優先権主張番号 9 3 / 1 5 7 9 8  
 (32) 優先日 1993年12月29日  
 (33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 サントル・ナショナル・ド・ラ・ルシエル  
 シュ・シヤンティフィク  
 フランス・エフ-75016パリ・リュミシエ  
 ルーアンジュ3  
 (71) 出願人 アンステイテユ・ナショナル・ド・ラ・サ  
 ンテ・エ・ド・ラ・ルシエルシュ・メデイ  
 カル  
 フランス・エフ-75654パリセーデクス  
 13・リュド トルビアク101  
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現の制御

## (57) 【要約】

本発明は新規ベクター、それを含む医薬組成物およびその治療における使用に関する。より詳細には本発明は、一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成するRNAをコードする二本鎖DNA分子に関する。該分子は遺伝子の発現に大変選択的かつ効率的に作用する。

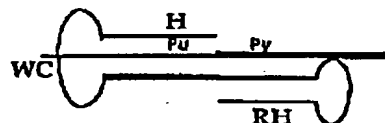


Fig. 4a

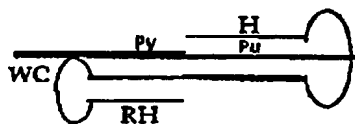


Fig. 4b

## 【特許請求の範囲】

1. 一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できるRNAをコードする二本鎖DNA。

2. 少なくとも

— 標的一本鎖核酸またはその一部分とダブルヘリックスを形成できる第一領域、  
— このように形成したダブルヘリックス、またはその部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

— 2つの領域を連結する1つまたは2つのアーム（このアームは各領域を連続的、または断続的にすることができる）、

を含む複合RNAをコードすることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の二本鎖DNA。

3. 複合RNAの第一領域がワトソン-クリック型の相互作用により標的一本鎖核酸とダブルヘリックスを形成し、そして次に第二領域がこのように形成したダブルヘリックスと水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型）によりトリプルヘリックスを形成することを特徴とする、請求の範囲第1または第2項に記載の二本鎖DNA。

4. 複合RNAの2つの領域がその間にワトソン-クリック型の対合によりダブルヘリックスを形成し、そしてこのダブルヘリックスが標的一本鎖核酸と水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型）により相互反応し、このようにしてトリプルヘリックスを形成することを特徴とする、請求の範囲第1または第2項に記載の二本鎖DNA。

5. 一標的一本鎖核酸またはその部分とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

— このように形成したダブルヘリックス、またはその部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

— 2つの領域をその末端で連結する2つのアーム、

を含む複合RNAをコードすることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の二本鎖DNA。

6. 一標的一本鎖核酸のオリゴプリン領域とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

—アーム、

—このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、

—標的とする一本鎖核酸のオリゴピリミジン領域とダブルヘリックスを形成できる、第一に連結された第三領域、

—第二アーム、および

—このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる、第三に連結した第四領域、

を含む複合RNAをコードすることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の二本鎖DNA。

7. アームが3-6個の塩基を含むことを特徴とする、請求の範囲第1ないし第6項のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

8. RNAが10塩基よりも長い長さ、そして好ましくは15塩基よりも長い長さを有することを特徴とする、請求の範囲第1ないし第7項のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

9. さらに混成RNAの転写を可能にするシグナルを含むことを特徴とする、前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

10. 転写シグナルが構成されたものであるか、または制御されることを特徴とする、請求の範囲第9項に記載の二本鎖DNA。

11. RNAポリメラーゼIIIにより特異的に制御される転写プロモーターを含んで成ることを特徴とする、請求の範囲第10項に記載の二本鎖DNA。

12. 一本鎖標的核酸が、例えばmRNA、tRNA、rRNAまたはウイルスRNAから選択され、そして一本鎖または部分的に開いた二本鎖DNAであることを特徴とする、前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

13. 配列番号2、3、4、5、6、7、8、10、11、13、14、15および17の配列から選択されることを特徴とする、前記請求の範囲のいずれか1

項に記載の二本鎖DNA。

14. 前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNAを含む発現ベクター。

15. 組換えウイルスであることを特徴とする、請求の範囲第14項に記載のベクター。

16. ウイルスが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ伴生ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルスおよびワクシニアウイルスから選択されることを特徴とする、請求の範囲第15項に記載のベクター。

17. 欠陥ウイルスであることを特徴とする、請求の範囲第15または第16項のいずれかに記載のベクター。

18. 同一または異なる、請求の範囲第1ないし第13項のいずれかに記載の多数の二本鎖DNAを含むことを特徴とする、請求の範囲第14

ないし第17項のいずれか1項に記載のベクター。

19. 前記請求の範囲のいずれか1項に記載の少なくとも1つの二本鎖DNAまたはベクターを含む医薬組成物。

20. 一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できるRNAをコードする少なくとも1つの二本鎖DNAを、DEAE-デキストランと、核タンパク質と、または脂質との複合体の状態で、裸の状態で、あるいはリポソームまたはナノパーティクル中に取り込まれた状態で含む医薬組成物。

21. 一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できることを特徴とするRNA。

22. 少なくとも：

- 標的一本鎖核酸またはその一部とダブルヘリックスを形成できる第一領域、
  - このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および
  - 2つの領域を連結する1つまたは2つのアーム（このアームは各領域を連続的、または断続的にすることができる）、
- を含む複合RNA。

23. 一 標的一本鎖核酸またはその一部とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

— 2つの領域をその末端で連結する2つのアーム、  
を含む複合RNA。

24. 一 標的一本鎖核酸のオリゴプリン領域とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

— アーム、

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、

— 標的とする一本鎖核酸のオリゴピリミジン領域とダブルヘリックスを形成できる、第一に連結された第三領域、

— 第二アーム、および

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる、第三に連結した第四領域、

を含む複合RNA。

25. 請求の範囲第1ないし第18項のいずれか1項に記載の二本鎖DNAまたはベクターを特別な細胞中へ導入することを含む、特定の細胞中で遺伝子発現を制御する方法。

## 【発明の詳細な説明】

遺伝子発現の制御

本発明は新規ベクター、それを含む医薬組成物および治療におけるその使用に関する。より詳細には本発明は、遺伝子の発現に高度に選択的かつ大変効率的に作用することができる新規ベクターに関する。

オリゴヌクレオチドによる標的遺伝子発現の制御は、益々発展している治療的方法を構成する。この方法は、オリゴヌクレオチドが核酸の相補的領域に特異的にハイブリダイズすることで、所定の遺伝子の発現を特異的に阻害する能力に基づく。この阻害は翻訳レベル（アンチー方向のオリゴヌクレオチド）または転写レベル（アンチー遺伝子オリゴヌクレオチド）のいずれかで妨害することができる。

アンチー方向のオリゴヌクレオチドは、標的細胞メッセンジャーRNAと選択的にハイブリダイズして、それらがタンパク質に翻訳されることを阻害できる核酸配列である。標的mRNAとこれらのオリゴヌクレオチドは、従来のワトソン-クリック型の相互作用により、RNA/mRNA、またはDNA/mRNA型でさえも局所的に二本鎖領域を形成する。これは例えば、細胞mRNAに相補的な標的細胞に導入された小サイズの合成オリゴヌクレオチドが関与しうる。そのようなオリゴヌクレオチドは、例えば欧州特許出願公開第92 574号明細書に記載された。これにはまた、標的細胞中の発現が細胞mRNAに相補的なRNAを生成するアンチー方向の遺伝子が関与することもできる。そのような遺伝子は例えば、欧州特許出願公開第140 308号明細書に記載された。

さらに最近では、標的遺伝子の発現を制御できる新しい種類のオリゴヌクレオチドが示された。これらのオリゴヌクレオチドは細胞mRNA

とハイブリダイズしないが、二本鎖としてゲノムDNAと直接ハイブリダイズする。この新たな方法は、DNAダブルヘリックスの主溝中で特異的に相互反応してトリプルヘリックスを局所的に形成し、標的遺伝子の転写阻害をもたらすことのできる一定のオリゴヌクレオチドがある、という実証に基づく。これらのオリゴヌクレオチドはDNAダブルヘリックスをオリゴプリン、オリゴピリミジン配

列で選択的に認識し、すなわち1つの鎖上にオリゴプリン配列および相補的鎖上にオリゴピリミジンを有する領域を認識し、そしてそこで局所的にトリプルヘリックスを形成する。第3鎖の塩基（オリゴヌクレオチド）は、ワトソン-クリック塩基対のプリンと水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン結合）を形成する。抗-遺伝子オリゴヌクレオチドは以下の塩基を含むことができる：ーチミジン（T）、これは二本鎖DNAのA・Tダブレットとトリプレットを形成できる(Rajagopalら、Biochem. 28(1989)7859)；

ーアデニン（A）、これは二本鎖DNAのA・Tダブレットとトリプレットを形成できる；

ーグアニン（G）、これは二本鎖DNAのG・Cダブレットとトリプレットを形成できる；

ープロトン化シトシン（C<sup>+</sup>）、これは二本鎖DNAのG・Cダブレットとトリプレットを形成できる(Rajagopalら、同上)。

アンチ-遺伝子オリゴヌクレオチドは特にHeleneにより、Anti-Cancer drug design 6 (1991) 569に記載された。

本発明は標的遺伝子の発現を制御するための新たな方法を記載する。これはより詳細には、一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成でき

る治療用RNAをインビボで遺伝的に生成することができる、ということが示されたことにある。好ましくはリボ核酸標的とトリプルヘリックスを形成できる治療用RNAのインビボにおける遺伝産物による。

特に本発明は、そのような治療用RNAをコードする二本鎖DNA配列に関する。また、遺伝子治療との関係で、このような治療用RNAのインビボ生成のために有用なベクターに関する。また、これらの二本鎖DNAまたはこれらのベクターを含む医薬組成物に関する。

本発明の別の観点は、上記のようなベクターによる標的細胞の形質転換により、細胞遺伝子の発現を制御する方法にある。

したがってさらに詳細には、本発明は一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できるRNAをコードする二本鎖DNAに関する。



本発明の二本鎖DNAは、より詳細には少なくとも

- 標的一本鎖核酸またはその部分とダブルヘリックスを形成できる第一領域、
- このように形成したダブルヘリックス、またはその部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および
- 2つの領域を連結する1つまたは2つのアーム、これは各領域を連続的、または断続的にすることができる、

を含む混成RNAをコードする。

本発明の第一の特定の態様では、複合RNAの第一領域は、ワトソン-クリック型の従来の相互作用により標的一本鎖核酸とダブルヘリックスを形成し、そして次に第二領域が水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型）によりこのダブルヘリックスと、またはその部分とトリプルヘリックスを形成する（図1-4を参照にされたい）。

本発明の別の特定の態様では、本発明の複合RNAの2つの領域が、ワトソン-クリック型のカップリングにより、それらの間でダブルヘリックスを形成し、そしてこのダブルヘリックスが水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型）により標的一本鎖核酸と相互作用し、このようにトリプルヘリックスを形成する（図5を参照にされたい）。

一本鎖標的化核酸は、例えばメッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA（rRNA）またはウイルスRNAのようなRNAであることができる。同等に、一本鎖DNA、例えば二本鎖DNAの複製中に、または自然に開いている局所的なDNA領域に現れるものであってもよい。

本発明は、ウイルス、特にRNAまたはDNAを一本鎖として含むウイルスの発現を、ウイルス周期の様々な段階で制御することに適する。様々な一本鎖核酸が、実際、本発明の治療用RNAの標的、具体的には、— ウイルスRNA（例えばレトロウイルス、ポリオウイルス、インフルエンザウイルス等のような、RNAを含むウイルスの場合）を構成することができる。本発明の治療用RNAの前記RNAに対する作用は、逆転写を阻害することを可能とし、すなわちウイルス周期の初期段階で作用し；

ープロウイルス（RNAを含むウイルスの場合）またはウイルスDNAに対して作用する。本発明の治療用RNAは、ウイルスまたはプロウイルスDNAが感染細胞のゲノムに取り込まれる前、または後に作用できる。この相互作用は、DNAダブルヘリックスが部分的に開いた後起こり、そして形成されたトリプルヘリックスは従来のトリプルヘリックス

よりもさらに一層安定である（アンチー遺伝子オリゴヌクレオチドが関与する）；

ーウイルスmRNA。本発明の治療用RNAのウイルスmRNAに対する作用は、ウイルスタンパク質の翻訳および発現を阻害できるようにする。

さらに詳細には、本発明のRNAは、好ましくはプリン塩基（AおよびG：polyPu領域）またはピリミジン塩基（T/UおよびC：polyPy領域）あるいはT/UおよびG塩基（polyT/U、G領域）から成る、領域中の標的とする一本鎖核酸とトリプルヘリックスを形成することができる。

したがって、標的とされた核酸（またはその特定の領域）は、実質的にプリン塩基（polyPu）から成り、本発明の治療用RNAは相補的なピリミジン塩基（ワトソン・クリック領域）、1つまたは2つのオリゴヌクレオチドアーム、ならびに塩基U、Cおよび／またはGから成る第二領域（フーグスティーン領域）を含むことができ、これは以下に述べる対合に従い形成されたダブルヘリックスのプリン塩基と相互作用する；塩基CおよびGはG。Cダブレットのグアニジンと水素結合を形成でき；塩基UはA。TまたはA。Uダブレットのアデニンと水素結合を形成できる。

この態様では、本発明の治療用RNAは、標的核酸またはその一部分の周囲に、第1a図に表す配置に従いループを形成する。

標的核酸（またはその特定の領域）が、本質的にピリミジン塩基（polyPy）から成る時、本発明の治療用RNAは相補的プリン塩基（ワトソン・クリック領域）、1つまたは2つのオリゴヌクレオチドアーム、および塩基UおよびGまたはAおよびGから成る第二領域（フーグスティーン領域）を含むことができる。

ーン領域)を含むことができ、これは以下に述べる対合に従い形成されたダブルヘリックスのプリン塩基と相互作用する；塩基GはG・Cダブレットのグアニンと水素結合(逆フーグスティーン)と形成することができ；塩基UおよびAはA・TまたはA・Uダブレットのアデニンと水素結合を形成できる。

この態様では、本発明の治療用RNAは第2図に表す配置に従い、標的核酸に平行するループを形成する。

標的核酸(またはその特定の領域)が実質的に塩基T/U、CまたはT/U、Gから成るとき、本発明の治療用RNAは相補的なプリン塩基から成る第一領域(ワトソン・クリック領域)、1つまたは2つのオリゴヌクレオチドアーム、およびプリン塩基の相補的なピリミジン塩基から成る第二領域(ワトソン・クリック領域も)を含むことができ、治療用RNAの第二領域は、プリン鎖が標的核酸とフーグスティーンまたは逆フーグスティーン結合を形成することにより相互作用するワトソン・クリックダブルヘリックスを形成する。

この態様では、本発明の治療用RNAは第5図に表す配置に従い、標的核酸に平行するループを形成する。

選択した一本鎖標的核酸組成に依存して、当業者は本発明の他の二本鎖DNA配列を定めることができ、これはワトソン・クリックダブレットおよびフーグスティーンまたは逆フーグスティーンの対合に基づくと考えられる。

本発明の治療用RNAの2つの領域を連結するアーム(1つまたは複数)は、RNAを構成する任意の塩基(A、U、GまたはC)を含むことができるオリゴヌクレオチド配列である。このアームの配列は、好ま

しくは局所的なトリプルヘリックスの形成を不安定化にしないように、それ自体では標的核酸と対合できてはならない。このアームの長さは、標的とする核酸の関数として、当業者により調整されることができる。これは一般的に、3から6塩基の間、好ましくは3から5塩基の間を含んで成る。

さらに特定の態様では、本発明の二本鎖DNAは、一本鎖標的核酸の周囲に、および/または平行して2つのループの形成を可能にする、2つのオリゴヌクレオチドアームを含む複合RNAをコードすることができる。そのような複合RN

Aは特に有利な特性を有する：

—まず最初に、複合RNAは一層大きな立体障害により、形成したトリプルヘリックスの安定性、ならびにその治療効果をさらに増加させることができる（図1 b、1 c、3 および4 を参照にされたい）；

—複合RNAは、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン領域を中断することにより、ピリミジンまたはプリン塩基でそれぞれ中断されたオリゴプリンまたはオリゴピリミジン中の一本鎖核酸を標的化できるようにする（図3 a および3 b を参照にされたい）。したがってこれは、任意の種類の本鎖核酸の領域に対するこれら治療用RNAの応用範囲を広くすることができる；

—また複合RNAは、オリゴプリン領域およびオリゴピリミジン領域を連結する鎖から成る一本鎖核酸を標的とすることを可能とし、そしてその逆も可能である（第4図）。したがってこのことはまた、本発明の治療用RNAの応用範囲を広くする。

本発明の特定の態様では、二本鎖DNAはしたがって、

—標的とする一本鎖核酸またはその部分とダブルヘリックスを形成でき

る第一領域、

—このように形成したダブルヘリックスまたはその部分と、トリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

—2つの領域をその末端で連結するアーム（図1 b、1 c、3 および4）を含む複合RNAをコードする。

この態様では、複合RNA（ワトソン-クリック（図1 b）、フーグスティーン（図1 c および3 a）または逆フーグスティーン（図3 b）の2つの領域の1つが、転写の開始部位を含むために中断されている。

本発明の別の特別な態様では、二本鎖DNAは

—標的一本鎖核酸のオリゴプリン領域とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

—アーム、

—このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを

形成できる第二領域、

— 標的とする一本鎖核酸のオリゴピリミジン領域とダブルヘリックスを形成できる、第一に連結された第三領域、

— 第二アーム、および

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる、第三に連結した第四領域、

を含む複合RNAをコードする(図4)。

本発明の二本鎖DNA(およびコードする混成RNA)は、好ましくは10塩基より大きい、より好ましくは15塩基より大きい長さを有する。この長さは治療用RNAの安定性、特異性および選択性を確実にするために、一本鎖標的核酸の長さの関数として当業者により調整される。

さらにトリプルヘリックスの安定性を向上するために、複合RNAをの領域の1つ、好ましくはダブルヘリックスを形成する領域を長くすることが有利かもしれない。

二本鎖DNAは、合成または半合成DNAであってよい。これは当業者により周知な任意の技術により得ることができ、そして特に核酸合成機により得ることができる。このDNAの配列は、上記のように選択した細胞標的の関数として定める。

有利なことには、本発明の二本鎖DNAは、標的細胞中で本発明の治療用RNAの転写(生産)を可能にするシグナルも含む。これらのシグナルはRNAの転写を開始する(プロモーター)ことを可能にする、そして場合によっては転写の停止(ターミネーター)を可能にする、ならびにRNAの安定化を可能にする(例えばpolyA尾)配列を含む。これらの様々なシグナルは、構成されたものであるか、または制御されることができる。特に、これらのシグナルは真核またはウイルス遺伝子のプロモーターの(promotive)配列あるいは合成プロモーターであってよい。例えば、それらは感染させようとする細胞のゲノムから派生するプロモーターの配列を含むことができる。同様に、それらはウイルスのゲノムから派生するプロモーターの配列を含むことができる。これとの関連で、例えばE1A、M

LP、CMV、RSV、HIVプロモーター等を挙げる事ができる。感染自体で、ウイルスに対する治療用RNAの生産を制御することが特に有利でありうる（例えば、HIVウイルスのLTRプロモーターを使用することにより、HIVタンパク質の存在下で特異的に誘導する）。さらに、これらの発現配列は、活性化または調節配列等を付加することによりモディファイされることができる。さ

らに、二本鎖DNAがいかなる発現配列も含まないとき、そのDNAをベクター中に、発現配列の下流で挿入できる。特に有利な発現系は、RNAポリメラーゼIIIにより特異的に制御される転写プロモーターの使用から成る。RNAポリメラーゼIIIは、実際、高い安定性を示し、そしてタンパク質に翻訳されない小細胞質または核RNAの合成の原因である。これらの小さいRNAは特にtRNA、rRNA、またはとくにアデノウイルスのVA RNAのような幾つかのウイルスRNAである。本発明の有利な態様によれば、二本鎖DNAはRNAポリメラーゼIIIにより特異的に転写されるプロモーターを含む。より詳細には、二本鎖DNAはRNAポリメラーゼIIIにより特異的に転写される遺伝子（仏国特許出願公開第2,687,411号明細書）に挿入されるか、またはそのような遺伝子の下流に融合される（欧州特許出願公開第387,775号明細書）。

本発明はこれまでの遺伝子発現の制御法と比較して、多くの利点を提供する。特に、一本鎖細胞核酸とトリプルヘリックスを形成できる本発明のRNAのインビボ生成は、治療用分子の細胞標的に関する選択性を増大させることができる。治療用薬剤としてのオリゴヌクレオチドの使用には、実際、細胞標的の特異的かつ選択的認識が必要である。したがって、クローズクロッピング(close-cropping)の場合には、発癌遺伝子のmRNAは癌原遺伝子のmRNAとは点突然変異だけが異なる。この場合には、オリゴヌクレオチドは発癌遺伝子の発現を出来る限り効率的に、しかし癌原遺伝子の発現には影響を与えずに阻害すべきである、ことが重要である。それゆえに、自由に使用できる高度に識別可能な治療薬を有することが重大である。従来のアンチ方向の場合には、標的配列の各塩基はオリゴヌクレオチド配列の1塩基により認識され、そして

1つの誤対合は二重鎖の形成および安定性にわずかな影響を与えることができるだけである。しかし、本発明の治療用分子の場合には、二重の認識が必要であり（標的配列中の各塩基が治療用RNAの2塩基により認識される）、そしてこれは識別力を大きく増大させる。

本発明の範囲で生成される治療用RNAは、従来のアンチ方向よりもより良い治療効果も有する。従来の場合は標的の周りにループを形成し、これが逆転写酵素またはDNAポリメラーゼをカップリングできないようにするものであるが、実際、本発明の治療用分子により生成される物理的障害は、従来のアンチ方向の場合よりは大きく、したがってmRNAのタンパク質への翻訳、伸長におけるリボソームに関与する酵素および／または他の因子に相互作用することができる。

さらに、トリプルヘリックスの形成により（ワトソンクリックおよびフーグスティーンまたは逆フーグスティーン結合）、本発明の分子は従来のアンチ方向のものよりも、標的とした核酸とのより安定な複合体を形成する。この性質は本発明の分子の利点をさらに強化し、それゆえに特に強力な治療薬を構成する。

最後に、本発明の治療用分子をインビボで生じる可能性により、これらの治療用分子を標的細胞中に導入された単一の二本鎖DNA（またはそれを含むベクター）から開始して、高レベルで生成することが可能となる。さらに、これらの分子を標的細胞の所望の細胞区画で、直接生成することを可能にする。

本発明の二本鎖DNAは、例えばヒトまたは動物に注射された後、所定の遺伝子の発現を制御するように使用できる。特に、国際公開第90/11092号明細書に記載されている技術を使用して、裸のDNAの状態で注

射することができる。また例えば、DEAE-デキストラン(Paganoら、J. Virol. 1(1967)891)と、核タンパク質(Kanedaら、Science 243 (1989) 375)と、または脂質(Felgnerら、PNAS 84 (1987) 7413)との複合状態で投与されてもよい。またリボソーム(Fraleyら、J. Biol. Chem. 255 (1980) 10431)またはナノパーティクルのような媒介物中に包含されることもできる。リボソームは、中に核酸をカプセル化することができる内部水性相を含むリン脂質液胞である。核酸を移転させるため

のリポソームの合成およびその使用は、従来技術で公知である（国際公開第91/06309号、第91/19752号、第92/19730号明細書）。ナノパーティクルは小さなサイズの粒子であり、一般的に500nmよりも小さく、有効成分（核酸のような）を細胞中または血液循環中に運搬または移動させることができる。ナノパーティクルは、場合によってはポリエチレングリコールと共重合したポリ乳酸のような分解性単位の部分を含むポリマーから成ることができる。ナノパーティクルの生成に有用な他のポリマーは、従来技術に記載されている（例えば、欧州特許出願公開第275 796号；同520 889号明細書を参照にされたい）。

本発明の二本鎖DNAは、好ましくはベクターの一部を形成する。そのようなベクターの使用は、実際、二本鎖DNAの標的細胞への転移効率を向上させ、そしてまた該細胞中でのその安定性を増大させることを可能とし、ならびに持続性の治療効果を得ることを可能にする。さらに、ベクターの使用は中で治療用分子が生成されるべき幾つかの細胞群を標的とすることを可能にする。さらに、多数の二本鎖DNAを同じベクター中に導入することが可能であり、そしてこれは治療効果を増大させる。

したがって本発明の別の主題は、標的とする一本鎖核酸とトリプルヘ

リックスを形成できるRNAをコードする二本鎖DNAを含むベクターに関する。

使用するベクターは、動物細胞を形質転換することができる限り様々な起源であってよく、好ましくはヒトの細胞である。同等にプラスミドまたはウイルスベクターを含むこともできる。本発明の好適な態様では、ウイルスベクターが使用され、これはアデノウイルス、レトロウイルス、アデノ-伴生ウイルス（AAV）、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、ワクシニアウイルス等から選択できる。

これと関連して、本発明の別の主題は、標的とする一本鎖核酸とトリプルヘリックスを形成できるRNAをコードする二本鎖DNAをゲノム中に挿入されたものを含む、任意の組換えウイルスである。

ヘテロロガスな核酸配列を取り込んだアデノウイルス、レトロウイルスまたは



AAVから派生したベクターは、文献に記載されている[Akliら、Nature Genetics 3(1993)224; Sreatford-Perricaudetら、Human Gene Therapy 1 (1990) 241; 欧州特許出願公開第185 573号明細書、Levreroら、Gene 101(1991)195; Le Gal 1 a Salleら、Science 259 (1993) 988; RoemerおよびFriedmann, Eur. J. Biochem. 20 8(1992)211; Dobsonら、Neuron 5 (1990) 353; Chioccaら、New Biol. 2(1990)739; ミヤノハラら、New Biol. 4(1992)238; 国際公開91/18088]。

有利には、本発明の組換えウイルスは欠陥ウイルスである。“欠陥ウイルス”という用語は、標的細胞中で複製できないウイルスを言う。したがって一般的に、本発明の範囲中で使用される欠陥ウイルスのゲノムは、感染細胞中で少なくとも該ウイルスの複製に必要な配列が欠けている。これらの領域は除去される（完全に、または部分的に）か、あるいは

は非機能的にされるか、あるいは他の配列、そして本発明の二本鎖核酸配列により特異的に置き換えられることができる。これにもかかわらず欠陥ウイルスは好ましくはそのゲノム中にウイルス粒子の包膜化に必要な配列を保存している。

本発明の核酸配列を欠陥組換えアデノウイルスに組込んだ状態で使用することが特に有利である。

実際、構造および特性がかなり変化した様々なアデノウイルス血清型が存在するが、これらはヒト、そして特に非免疫抑制個体に対して病原性ではない。さらに、これらのウイルスは感染した細胞のゲノムに組み込まれるようにはならず、そして外因DNAの巨大な断片を組み込むことができる。様々な血清型の中でも、2または5型アデノウイルス（Ad 2またはAd 5）が、本発明の範囲に好ましい。Ad 5アデノウイルスの場合には、複製に必要な配列はE 1 AおよびE 1 B領域である。上記に示したように、VA遺伝子に挿入された本発明の二本鎖DNAを含む欠陥組換えアデノウイルスを使用することが特に有利である。

さらに、本発明の小さなサイズの二本鎖DNAは、有利なことには同時に同じベクター中に多くのこれらDNA（これらは同一（同じ標的核酸に対する）または異なる（異なる標的核酸に対する））を取り込むことを可能にする。したがって本発明の特定の態様では、ベクター、特に少なくとも2つの上記二本鎖DNA

を含むウイルスのベクターから成る。

本発明の欠陥組換えウイルスは、欠陥ウイルスととりわけ上記に定義したような二本鎖DNAを持つプラスミドとの間の相同組換えにより調製できる (Levreroら、Gene 101(1991)195;Graham EMBO J.3(12)(1984) 2917)。相同組換えは、該ウイルスおよびプラスミドを適当な細胞株中

に同時トランスフェクションした後に起こる。使用する細胞株は組換えの危険性を回避するように、好ましくは組換え状態で (i) 該要素により形質転換されるべきであり、そして (ii) 欠陥ウイルスのゲノムの部分を相補できる配列を含むべきである。欠陥組換えアデノウイルスまたは組換えAAVの調製に使用できる株の例として、特にそのゲノム中にAd5アデノウイルスのゲノムの左部を組み込んだ(12%)ヒト胚腎臓系293 (Grahamら、J. Gen. Virol. 36(1977)59) を挙げることができる。欠陥組換えレトロウイルスの調製に使用できる株の例として、C R I P株を挙げるができる (DanosおよびMulligan, PNAS 85(1988)6460)。

次に再生したウイルスを従来の分子生物学的技術により回収し、そして精製する。

本発明のもう一つの主題は、上記に定義したような少なくとも1つのベクターまたは二本鎖DNAを含む医薬組成物に関する。

本発明の医薬組成物は局所、経口、非経口、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、目内またはたの経路による投与を行うために配合できる。

好ましくは医薬組成物は、注射することができる配合物のために医薬的に許容できるキャリアーを含む。これらは特に滅菌された、および／または等張の塩溶液 (リン酸1ナトリウムまたは2ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウムまたはマグネシウム等、あるいはそのような塩の混合物)、あるいは乾燥、特に凍結乾燥した組成物であってよく、これらは状況に応じて滅菌水または生理塩溶液の添加に際して、注射溶液を構成できる。

投与に使用されるDNA (またはベクター) の投与量は、様々なパラメーター、そして特に使用する投与様式、関連する病因、発現する核酸、

あるいは所望する治療期間に従い調整できる。一般的に本発明の組換えウイルスに関して、これらは $10^4$ – $10^{14}$ pfu/ml、好ましくは $10^6$ – $10^{10}$ pfu/mlの投与量の状態で配合され、そして投与される。pfuという用語 (“plaque forming unit: プラーク形成単位”) は、ウイルス溶液の感染力に相当し、そして適当な細胞カルチャーを感染させ、そして一般的に48時間後に感染細胞の面積を測定することにより決定される。ウイルス溶液のpfu含量を決定するための技術は文献に詳細に記載されている。

そのような医薬組成物は遺伝子の異常な発現 (細胞遺伝子の過剰発現、突然変異した遺伝子の発現等)、またはウイルス性疾患 (HIV) ヘルペス、肝炎等) から生じる疾患を治療および/または予防するために、ヒトに使用することができる。

本発明の別の主題は、特定の細胞中での遺伝子発現を制御する方法であり、該細胞中への上記に定義したような二本鎖DNAを導入することを含む。このDNAはそれ自体で、あるいは上記のようにベクター中に取り込まれた後、投与することができる。本発明のこの方法は細胞療法との関連で、生物から取り出され、そして再投与される前に特定の細胞群中での遺伝子のex vivo発現をモディファイするために特に使用できる。これには発現レベルが問題の病因においてモディファイされる遺伝子 (例えば発癌遺伝子、ウイルス遺伝子)、あるいは発現レベルは影響を受けないが、該病因の発生に参加する遺伝子 (レギュレーター遺伝子、GAPまたはGRF 遺伝子等) を含むことができる。

本発明の別の主題は、遺伝子発現をインビボで制御する方法であり、上記定義の医薬組成物を投与することを含む。

さらに本発明の主題は、異常な遺伝子発現から生じる疾患の治療法で

あり、それは該遺伝子の発現をモディファイできるRNAをコードする二本鎖DNAを含む上記に定義したような医薬組成物の投与を含む。

本発明は以下の説明をするものであつて制限するものではない実施例により、より完全に説明されている。

一般的なクローニング技法

プラスミドDNAの調製的抽出、プラスミドDNAの塩化セシウム勾配遠心、アガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動、電気溶出によるDNA断片の精製、タンパク質のフェノールまたはフェノールクロロホルム抽出、塩媒質中でのDNAのエタノールまたはイソプロパノール沈殿、大腸菌の形質転換等の分子生物学で従来から使用されている方法は、当業者は周知であり、文献に豊富に記載されている [Maniatisら、“モレキュラークローニング、アラボラトリーマニュアル:Molecular Cloning, a Laboratory Manual” コールドスプリングハーバー ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、コールドスプリングハーバー、N.Y., 1982; Ausubel F.M. ら、(編集)、“分子生物学の最新の方法: Current Protocols in Molecular Biology”、ジョン ウィリー アンド サン(John Wiley & Sons)、ニューヨーク、1987]。

pBR322、pUCおよびpSP65型のプラスミドならびにM13シリーズのファージは、市販されているものである(ベセスダリサーチラボラトリーズ: Bethesda Research Laboratories、プロメガ)。

ライゲーションのために、DNA断片をその大きさに従いアガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、フェノールまたはフェノール/クロロホルム混合物で抽出し、エタノールで沈殿させ、そしてファージT4のDNAリガーゼ(バイオラボズ:Biolabs)の存在下で、供給元

の推薦に従いインキューベーションすることができる。

5' 突出末端のファイリングは、大腸菌DNAポリメラーゼ I のクレノー断片(バイオラボズ)で、供給元の仕様に従い行うことができる。3' 突出末端の破壊は、ファージT4 DNAポリメラーゼ(バイオラボズ)の存在下で、製造元の推薦に従い行う。5' 突出末端の破壊は、S1ヌクレアーゼで制御された処理により行う。

合成オリゴデオキシヌクレオチドによるインビトロ部位特異的突然変異誘発法は、Taylorらにより開発された方法[Nucleic Acids Res. 13(1985)8749-8764]に従い、アマシャム(Amersham)により販売されているキットを使用して行うことができる。

DNA断片の酵素的増幅、いわゆるPCR法[Polymerase-catalysed Chain Re

action: ポリメラーゼ触媒連鎖反応、Saiki R.K. ら、Science 230(1985)1350-1354; Mullis K.B. および Faloona F.A., Meth. Enzym. 155(1987)335-350]法は、“DNAサーマルサイクラー”(パーキンエルマーシートス: Perkin Elmer Cetus)を使用して、製造元の仕様に従い行うことができる。

ヌクレオチド配列の確認はSangerらにより開発された方法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74(1977)5463-5467]により、アマシャムが市販しているキットを使用して行うことができる。

### 実施例

実施例 1: HIVウイルスのポリプリントラクト(Tract)配列に対するトリプルヘリックスRNAをコードする二本鎖DNAの合成。

この実施例では、HIVウイルスのゲノム中に2回存在する配列に対するトリプルヘリックスRNAをコードする様々な二本鎖DNAの合

成を記載する(BRUCG)。この配列は残基4369-4382および8662-8677の間に位置する。ポリプリン域またはPPTとして知られるこの配列は、DNAの+鎖の合成の開始に必須な役割を果たす。この領域中のトリプルヘリックスの形成は、ポリメラーゼ活性の特に効率的な阻害を生じ、したがってプロウイルスDNAの生成を妨害するはずである。

HIVウイルスのポリプリントラクト領域は、16個のプリン塩基を含み、その配列を配列番号1に表す。

この標的に対する本発明のトリプルヘリックスRNAをコードする様々な二本鎖DNAが合成された。合成は全自動核酸合成機により行い、Giovannangeli ら、(J. Am. Chem. Soc. 113(1991)7775)により記載された方法に従い、ホスホルアミダイト化学を採用した。これらDNAの配列を以下の表に示す。

PPT 標 的 配列番号 1	5'-CCACTTTTT <u>AAAAGAAAAGGGGGGA</u> CTGG-3'		
	8662		8677
DNA db	第2領域	アーム	第1領域
	5'		3'
配列番号 2	TTTTCCTTTTCCCCCCT	TTTTT	TCCCCCCTTTTCTTTTAA
配列番号 3	TTTTCCTTTTCCCCCCT	TTTTT	TCCCCCCTTTTCTTTTAA
配列番号 4	TTTTCCTTTTCCCCCCT	TTT	GTCCCCCCTTTTCTTTTAA
配列番号 5	TTTCCCCCCT	TCT	GTCCCCCCTTTT
配列番号 6	TTTGGGGGGT	TCT	GTCCCCCCTTTT
配列番号 7	TTTTCCTTTTCCCCCCT	TCT	GTCCCCCCTTTTCTTTT
配列番号 8	TTTTCCTTTTGGGGGGT	TCT	GTCCCCCCTTTTCTTTT

実施例2：H I V ウィスルの g a g 遺伝子に対するトリプルーヘリックスRNAをコードする二本鎖DNAの合成。

この実施例は、H I V ウィスルの g a g 遺伝子（この領域中に1つを

残基324と336との間（配列番号9）に、そしてもう1つを残基404と419との間（配列番号12）に含む）に対するトリプルーヘリックスRNAをコードする、様々な二本鎖DNAの合成を記載する。g a g 遺伝子はH I V ウィスルの構造タンパク質をコードし（MAp17、CAp24およびNCp15）、したがってウイルス粒子の包膜化および生産に必須である。

上記のように同定されるH I V ウィスルの g a g 遺伝子の2つの領域は、それぞれ13個および16個のプリン塩基を含む。

これら標的に対するトリプルーヘリックスRNAをコードする、本発明の様々な二本鎖DNAが合成された。合成は全自動核酸合成機により、Giovannangeliら、(J. Am. Chem. Soc. 113(1991)7775)により記載された方法に従い、ホスホルアミダイト化学を採用した。これらのDNA配列を以下の表に表す。

GAG 標 的 配列番号 9	5'-GCT <u>AGAAGGAGAGAGA</u> TGGG-3'		
	324	336	
DNA db	第2領域	アーム	第1領域
	5'		3'
配列番号 10	TCTTCCTCTCTCT	TATT	TCTCTCTCCTTCTTTT
配列番号 11	TGTTGGTGTGTGT	TATT	TCTCTCTCCTTCTTTT
GAG 標 的 配列番号 12	5'-GCC <u>AGGGGGAAGAAAAA</u> TAT-3'		
	404	419	
配列番号 13	TCCCCCTTTCTTTT	CTCC	TTTTTCTTTCCCCCTTTT
配列番号 14	TCCCCCTTTCTTT	CTCC	TTTCTTTCCCCCTTTT
配列番号 15	TGGGGGTTTGT	CTCC	TTTCTTTCCCCCTTTT

### 実施例3：本発明の二本鎖DNAによるHIVの感染周期の阻害

実施例1および2に記載した、本発明の二本鎖DNAの機能性を、様々な実験により、そして特に物理化学的研究により、転写、逆転写また

は翻訳のインビトロ実験により、ならびにウイルスの複製に対する効果を測定することにより実証する。

3. 1. 標的核酸と本発明の治療用RNAとの間の相互作用の物理化学の実験は、形成された複合体の熱力学的および動力学的特徴を得ることを可能とする。このために、上記のように合成された二本鎖DNAまたは治療用RNAを、標的核酸の存在下でインキュベーションし、そして次にこの反応で生じる複合体を吸光度分析により、およびゲルでの減速度実験により分析する。これらの様々な研究は、各治療用RNAがどのようにそれぞれの標的と相互作用できるかを表す。

3. 2. 標的配列を含む遺伝子の転写、翻訳、および逆転写に対する、プロモーター（SP6、T7またはT3）の制御下におかれた治療用RNAの効果の測定。これらのインビトロ実験では、ウイルス周期の各段階に対する本発明のRNAの効果を実験的に測定することを可能にする。より正確には、上記の二本鎖DNAまたはそれらがコードする複合RNAは、転写および／または翻訳に必要な成分および酵素を、プロモーターSP6（配列番号2-8のDNA用に）の制御下にHIVウイルス（これは配列番号1の配列を含む）のインテグラーゼの遺伝子を含むプラスミドの存在下で、あるいはプロモーターT7（配列番号10-11および13-15のDNA用に）の制御下にHIVウイルス（これは配列番号9お





## 配列表

## 配列番号： 1 の情報

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：29 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 一本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載：配列番号1：

CCACTTTTTA AAAGAAAAGG GGGGACTGG

29

## 配列番号： 2 の情報

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：39 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載：配列番号2：

TTTTCTTTTC CCCCCTTTT TTCCCCCTT TTCTTTTAA

39

## 配列番号： 3 の情報

## (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：38 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： c D N A

(xi) 配列の記載： 配列番号 3：

TTTTCTTTTC CCCCCTTTT TCCCCCTTT TCTTTTAA

38

配列番号： 4 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ： 38 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： c D N A

(xi) 配列の記載： 配列番号 4：

TTTTCTTTTC CCCCCTTTTG TCCCCCTTT TCTTTTAA

38

配列番号： 5 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ： 25 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： c D N A

(xi) 配列の記載： 配列番号 5：

TTTCCCCCCT TCTGTCCCCC CTTT

25

配列番号： 6 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ : 25 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の種類 : cDNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号 6 :

TTTGGGGGGT TCTGTCCCCC CTTT

25

配列番号 : 7 の情報

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 36 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の種類 : cDNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号 7 :

TTTTCTTTTC CCCCTTCTG TCCCCCTTT TCTTTT

36

配列番号 : 8 の情報

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 36 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の種類 : cDNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号 8 :

TTTTCTTTTG GGGGGTTCTG TCCCCCTTT TCTTTT

36

配列番号： 9 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載：配列番号9：

GCTAGAAGGA GAGAGATGGG

20

配列番号：10 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：33 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載：配列番号10：

TCTTCCTCTC TCTTATTCT CTCTCCTTCT TTT

33

配列番号：11 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：33 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載： 配列番号 11：

TGTTGGTGTG TGTTATTCT CTCTCCTTCT TTT

33

配列番号： 12 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ： 22 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載： 配列番号 12：

GCCAGGGGGA AAGAAAAAAT AT

22

配列番号： 13 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ： 39 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載： 配列番号 13：

TCCCCCTTTC TTTTCTCTCC TTTTCTTTT CCCCCCTTTT

39

配列番号： 14 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ : 33 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の種類 : cDNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号14 :

TCCCCCTTTC TTTCTCCTTT CTTTCCCCCT TTT

33

配列番号 : 15 の情報

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 33 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の種類 : cDNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号15 :

TGGGGGTTTG TTTCTCCTTT CTTTCCCCCT TTT

33

配列番号 : 16 の情報

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 23 塩基対

(B) 型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の種類 : cDNA

(xi) 配列の記載 : 配列番号16 :

AGAAGAGGGA GAGAGAGAGA AGG

23

配列番号：17の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：50 塩基対

(B) 型： 核酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(ii) 分子の種類： cDNA

(xi) 配列の記載：配列番号17：

TCTTCTCCCT CTCTCTCTCT TCCTCCGCCT TCTCTCTCTC TCCCTCTTCT 50

【図1】

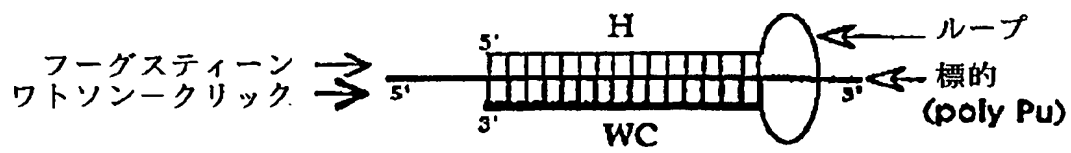


Fig. 1a

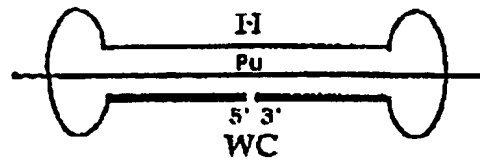


Fig. 1b

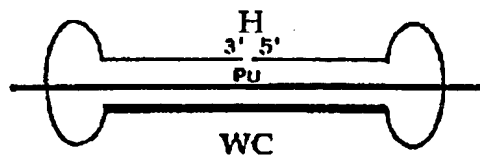


Fig. 1c

【図2】

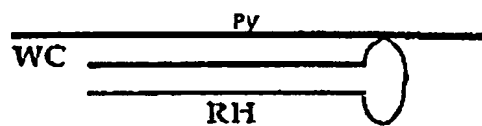


Fig. 2

【図3】

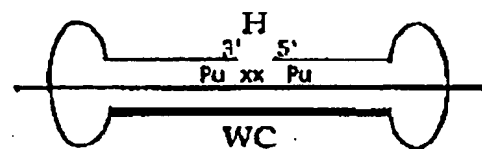


Fig. 3a

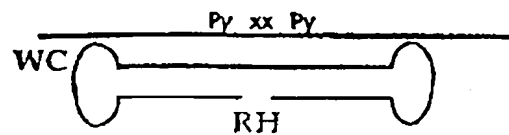


Fig. 3b



【図4】

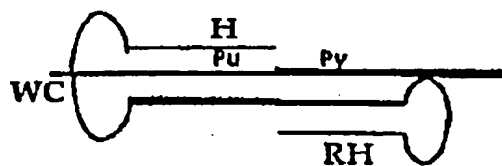


Fig. 4a

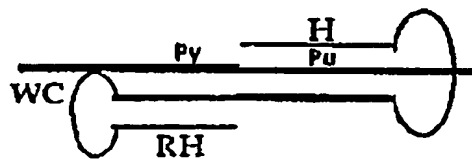


Fig. 4b

【図5】

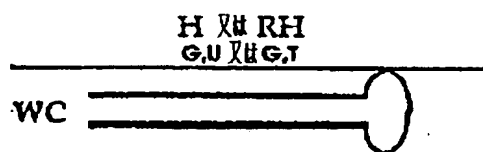


Fig. 5

【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1996年2月5日

【補正内容】

#### 請求の範囲

1. 一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できるRNAをコードする二本鎖DNA。

2. 少なくとも

ー 標的一本鎖核酸またはその部分とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

ー このように形成したダブルヘリックス、またはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

ー 2つの領域を連結する1つまたは2つのアーム（このアームは各領域を連続的、または断続的にすることができる）、

を含む複合RNAをコードすることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の二本鎖DNA。

3. 複合RNAの第一領域がワトソン-クリック型の相互作用により標的一本鎖核酸とダブルヘリックスを形成し、そして次に第二領域がこのような形成したダブルヘリックスと水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型）によりトリプルヘリックスを形成することを特徴とする、請求の範囲第1または第2項に記載の二本鎖DNA。

4. 複合RNAの2つの領域がその間にワトソン-クリック型の対合によりダブルヘリックスを形成し、そしてこのダブルヘリックスが標的一本鎖核酸と水素結合（フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型）により相互反応し、このようにしてトリプルヘリックスを形成することを特徴とする、請求の範囲第1または第2項に記載の二本鎖DNA。

5. 一標的一本鎖核酸またはその一部分とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

ー このように形成したダブルヘリックス、またはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

— 2つの領域をその末端で連結する2つのアーム、  
を含む複合RNAをコードすることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の二本鎖DNA。

6. 一標的一本鎖核酸のオリゴプリン領域とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

—アーム、

—このように形成したダブルヘリックスまたはその一部とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、

—標的とする一本鎖核酸のオリゴピリミジン領域とダブルヘリックスを形成できる、第一に連結された第三領域、

—第二アーム、および

—このように形成したダブルヘリックスまたはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる、第三に連結した第四領域、

を含む複合RNAをコードすることを特徴とする、請求の範囲第1項に記載の二本鎖DNA。

7. アームが3-6個の塩基を含むことを特徴とする、請求の範囲第1ないし第6項のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

8. RNAが10塩基よりも長い長さ、そして好ましくは15塩基よりも長い長さを有することを特徴とする、請求の範囲第1ないし第7項のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

9. さらに複合RNAの転写を可能にするシグナルを含むことを特徴とする、前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

10. 転写シグナルが構成されたものであるか、または制御されることを特徴とする、請求の範囲第9項に記載の二本鎖DNA。

11. RNAポリメラーゼIIIにより特異的に制御される転写プロモーターを含んで成ることを特徴とする、請求の範囲第10項に記載の二本鎖DNA。

12. 一本鎖標的核酸が、例えばmRNA、tRNA、rRNAまたはウイルスRNAから選択され、そして一本鎖または部分的に開いた二本鎖DNAであるこ

とを特徴とする、前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

13. 配列番号2、3、4、5、6、7、8、10、11、13、14、15および17の配列から選択されることを特徴とする、前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNA。

14. 前記請求の範囲のいずれか1項に記載の二本鎖DNAを含む発現ベクター。

15. 組換えウイルスであることを特徴とする、請求の範囲第14項に記載のベクター。

16. ウイルスが、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ伴生ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルスおよびワクシニアウイルスから選択されることを特徴とする、請求の範囲第15項に記載のベクター。

17. 欠陥ウイルスであることを特徴とする、請求の範囲第15または第16項のいずれかに記載のベクター。

18. 同一または異なる、請求の範囲第1ないし第13項のいずれかに記載の多数の二本鎖DNAを含むことを特徴とする、請求の範囲第14

ないし第17項のいずれか1項に記載のベクター。

19. 前記請求の範囲のいずれか1項に記載の少なくとも1つの二本鎖DNAまたはベクターを含む医薬組成物。

20. 一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できるRNAをコードする少なくとも1つの二本鎖DNAを、DEAE-デキストランと、核タンパク質と、または脂質との複合体の状態で、裸の状態で、あるいはリポソームまたはナノパーティクル中に取り込まれた状態で含む医薬組成物。

21. 遺伝子的にインサイチューで生成され、そして一本鎖標的核酸とトリプルヘリックスを形成できることを特徴とするRNA。

22. 少なくとも：

ー標的一本鎖核酸またはその一部とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

ーこのように形成したダブルヘリックスまたはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

— 2つの領域を連結する1つまたは2つのアーム（このアームは各領域を連続的、または断続的にすることができる）、

を含む、請求の範囲第21項に記載の複合RNA。

23. — 標的一本鎖核酸またはその一部分とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、および

— 2つの領域をその末端で連結する2つのアーム、

を含む、請求の範囲第21項に記載の混成RNA。

24. — 標的一本鎖核酸のオリゴプリン領域とダブルヘリックスを形成できる第一領域、

— アーム、

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる第二領域、

— 標的とする一本鎖核酸のオリゴピリミジン領域とダブルヘリックスを形成できる、第一に連結された第三領域、

— 第二アーム、および

— このように形成したダブルヘリックスまたはその一部分とトリプルヘリックスを形成できる、第三に連結した第四領域、

を含む複合RNA。

25. 請求の範囲第1ないし第18項のいずれか1項に記載の二本鎖DNAまたはベクターを特別な細胞中へ導入することを含む、特別な細胞中で遺伝子発現を制御する方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat 1 Application No  
 PCT/FR 94/01536

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/11 C12N15/86 C07H21/02 A61K31/70		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07H A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 90 (21). 1993. 10013-10017, GIOVANNANGELI, C. ET AL. 'Oligonucleotide clamps arrest DNA synthesis on a single - stranded DNA target.' see the whole document ---	1-4, 7-12, 14-19, 21,22,25
Y	FR,A,2 687 411 (UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS) 20 August 1993 cited in the application see the whole document ---	1-12, 14-25
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 April 1995		Date of mailing of the international search report 11-05-1995
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040; Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Andres, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 94/01536

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO,A,92 19732 (GENSET) 12 November 1992</p> <p>see page 17, line 11 - page 18, line 4</p> <p>see page 24, line 35 - page 25, line 33</p> <p>see page 33</p> <p>see figures 1,5</p> <p>see claims</p> <p>---</p>	1,2,5, 20,23
Y	<p>WO,A,91 06626 (GILEAD SCIENCES, INC.) 16 May 1991</p> <p>see page 4, line 31 - page 5, line 35</p> <p>see example 8</p> <p>see claims</p> <p>---</p>	1,2,6,24
A	<p>J AM CHEM SOC 113 (20). 1991. 7775-7777, GIOVANNANGELI, C. ET AL. 'SINGLE - STRANDED DNA AS A TARGET FOR TRIPLE - HELIX FORMATION.'</p> <p>cited in the application</p> <p>see the whole document</p> <p>---</p>	1-4,21, 22
A	<p>WO,A,93 12230 (SRI INTERNATIONAL) 24 June 1993</p> <p>see page 8, line 25 - line 31</p> <p>see page 28, line 34 - page 33, line 32</p> <p>see claims 19-23; figures 12B,13</p> <p>---</p>	1
T	<p>PURE &amp; APPLIED CHEMISTRY, vol. 66,no. 4, 1994</p> <p>pages 663-669,</p> <p>HELENE, C. 'Rational design of sequence-specific DNA ligands for artificial control of gene expression'</p> <p>see page 667, paragraph 3</p> <p>see figure 4</p> <p>---</p>	1-4
T	<p>GENE, vol. 149, 4 November 1994 AMSTERDAM NL, pages 115-121,</p> <p>KANDIMALLA, E. &amp; AGRAWAL, S. 'Single-stranded-targeted triplex formation: stability, specificity and RNase H activation properties'</p> <p>see figure 1</p> <p>-----</p>	1-4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/01536

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Note: Although claim 25 (for as long as it is related to in vivo methods) concerns a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the effects attributable to the product (to the composition).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/FR 94/01536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2687411	20-08-93	NONE	
WO-A-9219732	12-11-92	FR-A- 2675803	30-10-92
		AU-A- 1759692	21-12-92
		CA-A- 2102229	26-10-92
		EP-A- 0581848	09-02-94
		JP-T- 6506834	04-08-94
WO-A-9106626	16-05-91	US-A- 5399676	21-03-95
		AU-B- 641219	16-09-93
		AU-A- 7148191	31-05-91
		EP-A- 0539371	05-05-93
		JP-T- 5505101	05-08-93
WO-A-9312230	24-06-93	WO-A- 9312234	24-06-93

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
A 6 1 K 48/00		9051-4C	A 6 1 K 48/00	
C 0 7 H 21/02		8615-4C	C 0 7 H 21/02	
21/04		8615-4C	21/04	B
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ), AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, E E, FI, GE, HU, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SI, SK, TJ, TT, U A, US, UZ, VN			
(71) 出願人	ミュゼオム・ナショナル・ディストワール・ナテユレル フランス・エフー75005パリ・リュキユビエ57			
(72) 発明者	ジオバナンジェリ, カリーヌ フランス・エフー75005パリ・リュラレイ16			
(72) 発明者	エレヌ, クロード フランス・エフー75004パリ・ケドルレア ン14			

## 【要約の続き】

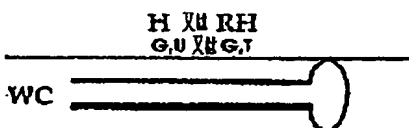


Fig. 5